نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۳٤، بهـار ۱۳۹۹
ص‌ص: ۳~۱۰

استخراج DNA از خون مرغ با استفاده از روش نمکی بهینه یافته

- **علی جوانروح علی‌آباد** (نویسنده مسئول)
عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور،سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
- **صابر جلوخانی‌نیارکی**
عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور،سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت : مهر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش : دی ۱۳۹۸

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۶۸۱۷۴۹
Email: a.javanrouh@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ aasrj.2019.128093.1188

چکیده:

استخراج DNA ژنومی با کیفیت مناسب در مطالعات مختلف ژنتیکی و اصلاح نژادی از اهمیت بالایی برخوردار است. اگرچه اصول استخراج DNA در سلول‌های مختلف گیاهی، جانوری و باکتریایی نسبتاً مشابه می باشد، اما به منظور کارآیی بالاتر، صرفه‌جویی در زمان و هزینه لازم است بر اساس هدف تحقیق، نوع گونه و نوع سلول تغییراتی در روش استخراج DNA ایجاد گردد. یکی از روش‌های استخراج DNA، روش نمکی یا Salting-Out می‌باشد که با انجام برخی تغییرات برای گونه‌های دام‌های اهلی بهینه‌سازی شده است. هدف از انجام پژوهش حاضر ارایه یک روش نمکی بهینه برای استخراج DNA از خون مرغ بود. بدین منظور، برخی تغییرات در حجم خون، مقدار مصرف مواد و بافرها و نیز روش جمع-آوری DNA تغلیظ شده ایجاد شد. به منظور ارزیابی روش بهینه شده، تعداد ٤۰۰ نمونه خون مرغ جهت استخراج DNA ژنومی مورد استفاده قرار گرفت. سپس کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد و اسپکتوفتومتری تعیین گردید. نتایج الکتروفورز نشان داد که نمونه‌های DNA استخراج شده کیفیت مطلوبی را داشته و کمترین میزان شکستگی را داشتند. همچنین نتایج ارزیابی کیفی نمونه‌های DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر نشان داد که نسبت جذب ۲٦۰ به ۲۸۰ در اغلب نمونه‌ها در محدوده ۱/۷ تا ۱/۹ قرار داشته که نشان دهنده کیفیت مطلوب و مناسب آن برای استفاده در مراحل بعدی از جمله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: مرغ، استخراج DNA، روش نمکی، ارزیابی کیفیت DNA

Applied Animal Science Research Journal No 34 pp: 3-10

DNA extraction from chicken blood using a modified Salting-out method

By: A. javanrouh*[1], S. Jelokhani-niaraki[2]
1: Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2: faculty member at the Biotechnology department in the Animal Science Research Institute of Iran

Extraction of high-quality genomic DNA is of great importance in various genetic and breeding studies. Although the principles of DNA extraction from different plant, animal, and bacterial cells are relatively similar, but in order to make it more efficient, save the time and cost, there is a need to make some changes in the DNA extraction method based on the purpose of research, the species and cell kind. One of the DNA extraction methods is salting-out method, which is optimized to the livestock species by making some changes. The objective of this study was to present an optimized Salting-Out method for DNA extraction from chicken blood. For this purpose, some changes were made in the blood volume, the amount of consumed materials and buffers, and also the method of condensed DNA collection. To evaluate the optimized method, 400 chicken blood samples were used for genomic DNA extraction. Then the quality and quantity of extracted DNA were determined by electrophoresis on 1% agarose gel and spectrophotometry methods. The results of electrophoresis showed that sharp DNA bands visualized in gel with the lowest fracture rate, indicating the desired quality of extracted DNA samples. Also, the results of quality assessment of DNA samples using spectrophotometry showed that the absorption ratio of 260 to 280 nanometer in most samples range from 1.7 to 1.9, indicating that they are appropriate for use in next steps including polymerase chain reaction.

Key words: chicken, DNA extraction, Salting-Out method, DNA Qualitative evaluation

مقدمه

دئوکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) نوعی اسید نوکلئیک می-باشد که حامل دستورالعمل‌های ژنتیکی برای فعالیت‌های زیستی موجودات زنده بوده و به نوعی مسئول ذخیره‌سازی اطلاعات ژنتیکی هر فرد محسوب می‌شود. مولکول DNA به عنوان ماده وراثتی در هسته سلول‌ها قرار گرفته و به صورت مولکول دو رشته ای از اتصال نوکلئوتیدها به یکدیگر ساخته شده است. تمام سلول-های هسته‌دار دارای DNA هستند. بنابراین از نمونه خون و یا هر نمونه بافتی می‌توان DNA استخراج نمود (Siden et al, 1998). اصول استخراج DNA از سلول‌های مختلف باکتریایی، گیاهی و جانوری نسبتاً مشابه می‌باشد و تنها در برخی از موارد جزئی تفاوت‌هایی وجود دارد. به طور کلی استخراج DNA شامل پنج مرحله می‌باشد: ۱-تهیه نمونه‌های زیستی مورد نظر، ۲-هضم دیواره سلولی و غشاء (غشاء سیتوپلاسمی و غشاء اطراف هسته) جهت تهیه عصاره سلولی، ۳- خالص سازی DNA با حذف سایر مواد موجود در سلول (پروتئین‌ها، RNA و ترکیبات دیگر) ، ۴-تغلیظ و رسوب دادن DNA و ۵-محلول-سازی DNA در آب دو بار تقطیر و یا بافر TE می‌باشد (Chacon-Corten & Griffiths, 2014).

بر خلاف پستانداران، در پرندگان از جمله در طیور، گلبول های قرمز دارای هسته بوده و حاوی DNA می باشند. در نتیجه در صورت استفاده از حجم خون مشابه با پستانداران، انتظار می رود که مقدار DNA خیلی بیشتری استخراج گردد (Khosravinia et al, 2007). باید توجه نمود که نمونه های خون تهیه شده باید حاوی ماده ضدانعقاد خون مثل سیترات سدیم و یا EDTA باشند تا از لخته شدن نمونه های خون پس از نمونه گیری جلوگیری گردد. نباید از ماده ضد انعقاد هپارین برای استخراج DNA ن

استفاده کرد ، زیرا هپارین یک گلیکوآمینوگلیکان سولفاته با بار منفی زیاد می باشد و می تواند فعالیت آنزیم Taq پلیمراز را در واکنش زنجیره ای پلیمراز مختل نموده و به عنوان یک عامل ممانعت کننده واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) عمل می کند (Al-Soud and Radstrom, 2001). نمونه های تهیه شده باید بر روی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شوند و در صورتی که قرار است بلافاصله استخراج DNA انجام گیرد، در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شود. ولی در صورتی که برای مدت طولانی به صورت خون کامل نگهداری و سپس استخراج انجام خواهد شد، بایستی نمونه های خون به دمای ۲۰- سانتیگراد منتقل گردد (Huang et al, 2017). در مرحله بعد به منظور تهیه عصاره سلولی در سلول های جانوری بعلت فقدان دیواره سلولی با یک شوک اسمزی ساده می توان غشاء سلول‌ها را شکست. برای شکستن سلول‌ها ازدو روش فیزیکی و شیمیایی استفاده می-شود که برای استخراج DNA روش‌های شیمیایی متداول است. تجزیه شیمیایی نیازمند یک عامل شیمیایی بر دیواره سلولی و یک عامل پاره کننده غشای سلولی است. معمولا برای تضعیف دیواره سلولی از لیزوزوم، اتیلن دی آمین ترا استات(EDTA) و یا مخلوطی از هر دو استفاده می شود. لیزوزوم، ترکیبات پلیمری تأمین کننده چسبیدگی دیواره سلولی را هضم می‌کند. از طرف دیگر EDTA یونهای منیزیم لازم برای حفظ ساختار کلی غشای سلول را حذف کرده و آنزیم‌های تجزیه کننده DNA را مهار می‌کند. برای حذف غشاء، از ترکیبات شوینده یا دترجنت مثل SDS (سدیم دو دسیل سولفات) و تریتون نیز استفاده می شود. SDS با حذف مولکول‌های چربی در غشای سلول به فرایند تجزیه غشای سلول کمک کرده و به پایداری اسیدهای نوکلئیک کمک می‌کند. همچنین تریتون به عنوان یک پایین آورنده کشش سطحی غشاء سلول، باعث متلاشی شدن غشای سلول می‌گردد. پس از تجزیه سلول‌ها، بقایای سلولی غیرمحلول با انجام سانتریفیوژ رسوب داده شده تا عصاره سلولی به صورت مایع رویی بدست آید. این عصاره سلولی علاوه بر DNA، شامل مقدار قابل توجهی پروتئین و RNA می باشد (Sambrook and Russel, 2001). در مرحله خالص سازی DNA روش‌های مختلفی وجود دارد. سه روش عمده برای خالص سازی عبارتند از:

روش فنل- کلروفرم، روش نمکی یا Salting-out و روش استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی. روش استاندارد استخراج DNA ، روش فنل-کلروفرم می باشد که به نسبت ۱:۱ به نمونه‌ها اضافه شده و به عنوان حلال‌های آلی باعث رسوب پروتئین‌ها می-شود. با انجام سانتریفیوژ، سه لایه شامل فاز آبی در قسمت بالا و حاوی مولکول‌های DNA و RNA ، لایه وسط مربوط به آلودگی‌های پروتئینی و فاز آلی در قسمت تحتانی و حاوی فنل و کلروفرم می‌باشد (Green and Sambrook, 2017). در روش نمکی بجای فنل از آنزیم پروتئیناز K جهت تجزیه پروتئین-ها استفاده شده و سپس با استفاده از نمک فوق اشباع (۶ مولار)، پروتئین‌ها رسوب و DNA خالص بدست می‌آید (Miller et al, 1988). روش استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی بر اساس اختلاف بار الکتریکی طراحی شده است. در این روش مولکول‌های دارای بار منفی مثل DNA و RNA به ذرات باردار مثبت مثل رزین، سیلیس و آهن متصل می‌شوند. با اضافه کردن نمک، پیوندهای الکتریکی به تدریج از بین رفته و با انجام سانتریفیوژ با سرعت پایین، از ستون مربوطه می‌توان خارج کرد. معمولاً با غلظت پایین نمک، RNA و پروتئین‌ها از ستون عبور داده شده و جدا می‌شوند (پیوند ضعیفتری با ذرات باردار دارند) و در مرحله بعد به دلیل پیوند قوی‌تر مولکول DNA با ذرات بار دار، با افزایش غلظت نمک مولکول‌های DNA از ستون عبور داده شده و استخراج می‌شود (Budelier & Schorr, 1998). در مرحله رسوب دادن DNA که مرحله پایانی استخراج می‌باشد، معمولا برای متراکم ساختن DNA از روش رسوب دهی با اتانول و یا ایزوپروپانول استفاده می‌شود. اتانول مطلق در حضور نمک استات سدیم (به دلیل حضور کاتیونهای Na^+) باعث رسوب DNA می‌شود و کلاف DNA ظاهر شده و می‌توان با استفاده از میله شیشه ای و یا انجام سانتریفیوژ با دور بالا (۱۲ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه)، DNA را استخراج نمود. به منظور حذف یون‌های سدیم متصل به DNA معمولاً نمونه‌ها را با الکل

۷۰ درصد شستشو و پس از خشک کردن DNA می‌توان نمونه-های DNA را در بافر TE و یا آب دوبار تقطیر حل نمود. برای حل شدن بهتر پلت DNA و همچنین برای حذف مولکول‌های RNA که احتمالا همراه با مولکولهای DNA استخراج شده اند، نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بن ماری قرار می‌گیرد و سپس نمونه‌های DNA به ۲۰ - درجه منتقل می‌گردد (Vaibhavi et al, 2014). به طور کلی اگرچه اصول استخراج DNA در سلول‌های مختلف تقریباً مشابه است، ولی با توجه به ماهیت بافت مورد نظر و نوع گونه بایستی تغییراتی را در مراحل استخراج DNA اعمال نمود تا مشکلات تکنیکی در طول مراحل استخراج به حداقل رسیده و DNA ژنومی با کیفیت مطلوب و با کارایی مناسب استحصال گردد. با توجه به هسته دار بودن گلبول های قرمز خون پرندگان و مشکلات مربوط به استخراج DNA از خون مرغ که اشاره شد، هدف از این مقاله معرفی یک روش جدید استخراج DNA از خون مرغ بر پایه روش نمکی با کارآیی بهتر می باشد.

مواد و روش ها

تهیه نمونه و استخراج DNA

در این تحقیق از تعداد ۴۰۰ نمونه خون مرغ جهت استخراج DNA استفاده شد. نمونه های خون به حجم ۱ سی سی توسط سرنگ از سیاهرگ ناحیه مثلثی زیر بال پرنده تهیه شد و بلافاصله به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی لیتری حاوی ماده ضد انعقاد اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) منتقل و پس از مخلوط شدن خون با ماده ضد انعقاد در داخل یخ خشک به آزمایشگاه بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور انتقال داده شد. لازم به ذکر است که EDTA یکی از مواد ضد انعقاد کننده خون می‌باشد که به صورت نمک‌های دی‌سدیم (Na_2EDTA)، دی-پتاسیم (K_2EDTA) و تری‌پتاسیم (K_3EDTA) مورد استفاده قرار می‌گیرد که به راحتی در آب حل می‌شود. به ازای هر میلی-لیتر خون، ۱/۵ میلی‌گرم EDTA دی سدیم و یا دی‌پتاسیم و ۱/۲ میلی گرم EDTA تری پتاسیم مورد نیاز است. در این تحقیق از Na_2EDTA با مقدار ۱/۵ میلی گرم در هر میلی لیتر به عنوان ماده ضد انعقاد خون استفاده شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- سانتیگراد نگهداری شدند. به منظور استخراج DNA از نمونه‌های خون مرغ با استفاده از روش نمکی، با توجه به مشکلاتی از قبیل رسوب بسیار زیاد و باقی ماندن لخته حاوی گلبول قرمز، انجام ورتکس مکرر، تکرار مراحل اولیه استخراج جهت استحصال رسوب سفید حاوی هسته‌ها، نیاز به مقدار زیادی پروتئیناز K جهت شکستن پیوند پروتئین‌های هیستونی از رشته DNA، باقی ماندن آلودگی مربوط به پروتئین و RNA در مراحل انتهایی و قبل از تغلیظ DNA، زمانبر بودن استفاده از میله شیشه‌ای، خشک شدن و حل کردن نمونه‌های DNA و در نهایت کیفیت پایین DNA استخراج شده، در روش نمکی تغییراتی ایجاد شد. مراحل استخراج به ترتیب ارائه شده است:

۱- تهیه ۵۰ میکرولیتر خون کامل حاوی ماده ضد انعقاد و انتقال آن به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری

۲- اضافه نمودن ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر جداکننده[1]

(5mM $Mgcl_2$, 0.32M Sucrose, Triton X-100 1%, 10mMTris-Hcl- pH=7.5)

۳- سانتریفیوژ (ساخت شرکت Sigma مدل 1k15) محلول فوق به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه (در دمای ۴ درجه سانتیگراد)

۴- تخلیه مایع رویی و نگهداری رسوب حاصله

۵- اضافه نمودن ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر جداکننده به رسوب حاصله، انجام ورتکس و تکرار مراحل ۳ تا ۵، تا زمانی که یک رسوب سفید حاصل شود

۶- اضافه نمودن ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده[2] به رسوب حاصله و انجام ورتکس

(400mM Nacl, 2mM Na_2EDTA, 10mM Tris-Hcl - pH=8.2)

۷- اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد و ۱۵۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K (با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محلول حاصله

1 - Separate buffer
2 - Lysis buffer

۸- همگن کردن نمونه‌ها و قرار دادن نمونه‌ها در حمام آب گرم در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت

۹- اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر NaCl فوق اشباع (تقریباً ۶ مولار) به محلول و تکان شدید نمونه‌ها به مدت ۱۵ ثانیه

۱۰- سانتریفیوژ محلول به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه

۱۱- انتقال مایع رویی به یک میکروتیوب استریل دیگر و اضافه کردن هم حجم محلول کلروفرم و مخلوط کردن نمونه‌ها

۱۲- انجام سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه

۱۳- انتقال فاز آبی حاوی DNA به یک میکروتیوب استریل جدید

۱۴- اضافه کردن ۰/۱ حجم محلول فوق استات سدیم ۳ مولار و ۱/۵ برابر اتانول مطلق سرد به نمونه‌ها تا ظاهر شدن کلاف DNA

۱۵- انجام سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه جهت گرفتن پلیت DNA و حذف مایع رویی

۱۶- اضافه نمودن ۸۰۰-۷۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد به پلیت-های حاصله جهت شستشو و سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه

۱۷- حذف مایع رویی، نگهداری پلیت‌ها و خشک کردن نمونه‌ها در مجاورت دمای اتاق

۱۸- اضافه کردن ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر یا بافر TE به هر یک از نمونه‌های حاوی پلیت

(10mM Tris Hcl, 0.2mM Na_2EDTA- pH=7.5)

۱۹- انتقال نمونه‌های DNA به بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت جهت حل شدن پلیت‌ها و سپس به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد

لازم به توضیح است که مواد شیمیایی مورد استفاده مربوط به شرکت Merck آلمان و سانتریفیوژ مورد استفاده ساخت شرکت Sigma آلمان مدل 1k15 می‌باشد.

ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده

پس از استخراج DNA، کیفیت آن با دو روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز و اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز، ابتدا ژل آگارز یک درصد تهیه شد و سپس مقدار ۵ میکرولیتراز هر نمونه DNA با مقدار ۳ میکرولیتر بافر لودکننده مخلوط و در چاهک‌های مربوطه بارگذاری شده و با ولتاژ ۸۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز گردیدند. سپس با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید، رنگ آمیزی انجام و پس از شستشو با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور و با نور UV باندهای DNA قابل رویت گردید.

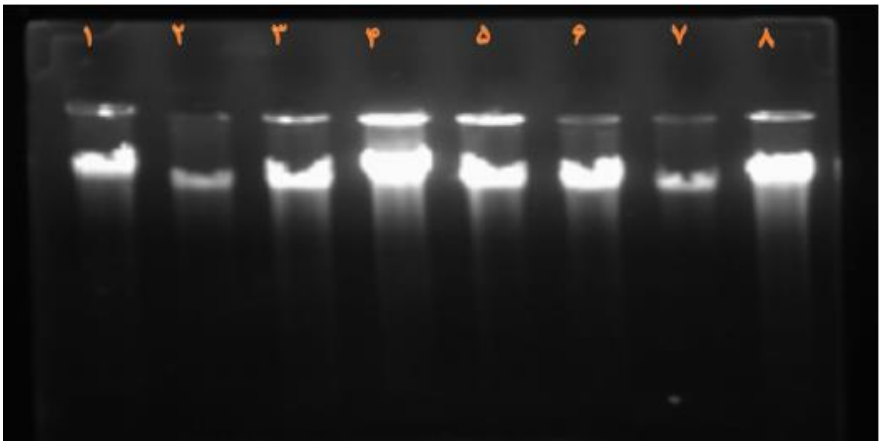
در این تحقیق، به منظور ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتوفتومتری،۱۰ درصد از نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل ND-1000 مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این روش، می‌توان بر اساس نسبت حداکثر جذب نوری مولکول DNA در طول موج 260nm به حداکثر جذب نوری آلودگی‌های پروتئینی در طول موج 280nm به عنوان معیاری برای ارزیابی درجه خلوص و کیفیت DNA استخراج شده استفاده نمود.

نتایج و بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که، می‌توان با انجام تغییراتی در روش استخراج نمکی بهینه‌یافته برای استخراج DNA از خون مرغ، کارآیی روش را بهبود و کیفیت DNA استخراج شده را افزایش داد. در روش استاندارد نمکی که اولین بار توسط Miller و همکاران در سال ۱۹۸۸ ارائه شد، برای جداسازی سلول‌های هسته‌دار خون از سانتریفیوژ استفاده گردید. جداسازی سلول‌های هسته‌دار خون (شامل گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها) که به صورت یک لایه نازک در بین پلاسمای خون و هماتوکریت (گلبول‌های قرمز) قرار دارند، مشکل می‌باشد. برای حل این مشکل از بافر جداکننده استفاده شد، به طوری که با اضافه نمودن آن به خون، دیواره سلولی تخریب گردید و با انجام سانتریفیوژ، هسته سلول‌ها در انتهای میکروتیوب رسوب نمودند. با توجه به اینکه در پرندگان

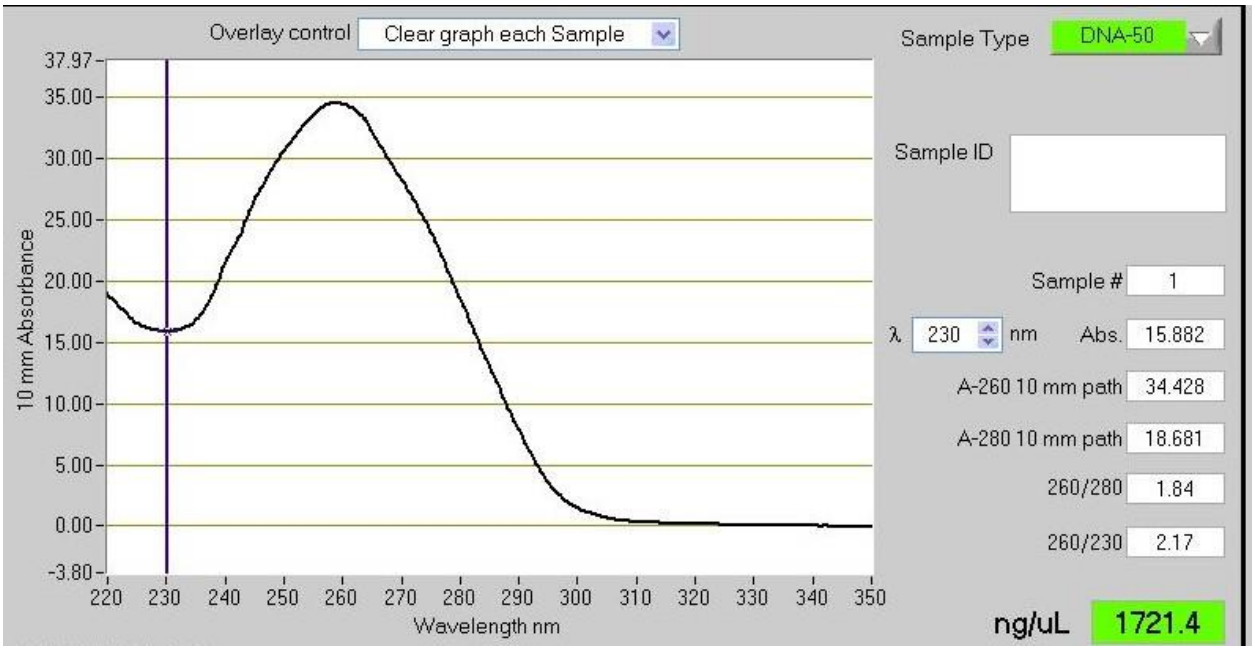
از جمله مرغ، گلبول‌های قرمز نیز دارای هسته می‌باشند، لذا در پژوهش حاضر با کاهش حجم خون به ۵۰ تا ۸۰ میکرولیتر، از رسوب زیاد هسته در انتهای تیوب جلوگیری شد و نیاز به استفاده از تیوب‌های با حجم بیش از ۲ میلی‌لیتر نیز مرتفع گردید. لازم به توضیح است که در سایر گونه‌های اهلی از جمله گاو، گاومیش، اسب، گوسفند و بز به دلیل اینکه تنها گلبول‌های سفید دارای هسته می‌باشند، حجم خون بیشتری (بیش از ۱ سی‌سی خون)، جهت استخراج DNA مورد نیاز است و اغلب از فالکون های بزرگ ۱۴ سی سی برای استخراج DNA استفاده می‌شود که نسبت به میکروتیوب ۲ سی‌سی هزینه بالاتری داشته و نیاز به دستگاه سانتریفیوژ بزرگ یخچالدار می‌باشد. همچنین در طول مراحل استخراج DNA مقدار کمتری بافر جداکننده، بافر لیزکننده، پروتئیناز K ، نمک، کلروفرم و اتانول مطلق مورد نیاز خواهد بود و به لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه‌تر می‌باشد. در استخراج DNA با روش های فنل-کلروفرم-ایزوامیل الکل و فنل-کلروفرم که به ترتیب توسط Sambrook و همکاران در سال ۱۹۸۹ و Green و Sambrook در سال ۲۰۱۷ توسعه وارائه شد، پس از اعمال هضم آنزیمی با آنزیم پروتئیناز k ، از فنل اشباع شده جهت واسرشتن و جداسازی پروتئین‌ها از اسیدهای نوکلئیک استفاده می شد (Sambrook et al, 1989; Green and Sambrook, 2017). فنل یک ماده بسیار سمی است و به راحتی از سطح پوست جذب بدن شده و اشباع کردن فنل نیز کار زمانبر و پرخطر بوده و نیاز به رعایت موارد ایمنی می‌باشد. در حالیکه در روش ارائه شده ،نیازی به استفاده از این ماده سمی نبوده و کیفیت DNA استخراج شده مطلوب می‌باشد. همچنین با تغییرات انجام شده از مشکلات مربوط به باقی ماندن گلبول‌های قرمز به همراه رسوب در مراحل ابتدایی استخراج تا حد زیادی جلوگیری به عمل آمد به طوریکه نیاز به انجام ورتکس‌های مکرر و تکرار مراحل اولیه استخراج نبوده، لذا در زمان استخراج صرفه-جویی به عمل می‌آید. از طرف دیگر، به دلیل استحصال رسوب سفیدتر و کوچکتر، تاثیر بافر لیزکننده، SDS و آنزیم پروتئیناز K در شکستن پیوندهای پروتئینی بهتر و در مرحله اضافه کردن نمک فوق اشباع، بخش زیادی از آلودگی‌ها جداسازی و در مرحله اضافه کردن کلروفرم نیز باقی مانده آلودگی‌های پروتئینی از فاز آبی حاوی DNA خارج شد. همچنین در روش‌های قبلی ، جمع-آوری DNA با میله شیشه‌ای ، باعث طولانی شدن مراحل استخراج و خشک شدن نمونه‌های DNA در هوای اتاق می‌شد، که ممکن بود نمونه‌ها دچار آلودگی شوند و نیز این احتمال وجود داشت که حل شدن DNA چسبیده به میله شیشه‌ای به راحتی انجام نشده و بخشی از DNA از میله شیشه‌ای جدا و به میکروتیوب حاوی بافر TE منتقل نگردد. در این تحقیق، بدون نیاز به میله شیشه‌ای، نمونه‌های DNA به صورت پلت در انتهای میکروتیوب رسوب داده شدند که پس از شستشو با اتانول ۷۰ درصد و خشک شدن در داخل همان میکروتیوب، در نهایت در بافر TE یا آب دوبار تقطیر حل می‌شوند. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، نمونه‌های DNA استخراج شده، دارای باندهای کاملاً قوی[3] با کمترین شکستگی و کشیدگی[4] بر روی ژل بوده که نشان می‌دهد کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده مناسب می‌باشد.

3- Sharp
2- Smear



شکل ۱: کیفیت ۸ نمونه DNA استخراج شده از خون مرغ بر روی ژل آگارز ۱ درصد

همچنین در پژوهش حاضر، نتایج ارزیابی کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ نیز نشان داد که نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در اغلب نمونه‌ها در محدوده ۱/۷ تا ۱/۹ قرار داشتند و برای انجام مراحل بعدی از جمله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مناسب می‌باشند (شکل ۲). لازم به ذکر است که هر چه نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر کمتر از عدد ۱/۸ باشد نشاندهنده آلودگی پروتئینی و اعداد بالاتر از ۱/۹نشان دهنده وجود RNA در نمونه های DNA می باشد. همانطوریکه در شکل ۲ نشان داده شده است، در محدوده طول موجهای ۲۴۰ تا ۲۸۰جذب نوری اسیدهای نوکلئیک از جمله مولکول DNA وجود دارد، ولی بیشترین میزان جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر بوده و کیفیت DNA استخراج شده بر اساس نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، در محدوده ذکر شده قرار دارد.



شکل ۲: گراف مربوط به کیفیت و مقدار DNA استخراج شده از یک نمونه خون مرغ با استفاده از دستگاه نانودراپ

توصیه ترویجی

با وجود اینکه روش‌های مختلفی برای استخراج DNA در مطالعات ژنتیکی موجود می‌باشد، پروتکل ارائه شده در این تحقیق می‌تواند به عنوان یک روش کاربردی، ساده و اقتصادی به منظور استخراج DNA از خون مرغ معرفی گردد.

منابع

Al-Soud, W. A. and Radstrom, P. (2001). Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells, Journal of clinical microbiology, 39(2), 485-493.

Budelier, K. and Schorr, J. (1998). Purification of DNA by AnionExchange Chromatography. Current Protocol in Molecular Biology. doi: 10.1002/0471142727.mb0201bs42.

Chacon, C. D. and Griffiths, L.R. (2014). Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. Journal of Biorepository science for Applied Medicine, 2: 1-9.

Green, M.R., and Sambrook, J. (2017). Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents. Cold Spring Harb Protocol, (4): doi: 10.1101/pdb.prot093450.

Huang, L-H., Lin, P-H., Tsai, K-W., Wang, L-J., Huang, Y-H., Kuo, H-C. and Li, S-C. (2017). The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. Plos One, 12(9): doi: 10.1371/journal.pone.0184692.

Karp, A., Isaac, P.G., Ingram, D.S. (1998) Isolation of Nucleic Acids Using Anion-Exchange Chromatography: QIAGEN-tip Based Methods. Molecular Tools for Screening Biodiversity. Springer, Dordrecht

Khosravinia, H., Murthy, H.N., Parasad, D.T., and Pirani, N. (2007) Optimizing factors influencing DNA extraction from fresh whole avian blood. African Journal of Biotechnology, 6(4): 481-486.

Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16: 1215.

Sambrook, J., Fritschi, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, cold spring harbor laboratory press, New York.

Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition.

Siden, R.R., Pearson, C., Potaman, V.N. and Ussery, D.W. (1998) DNA: Structure and function. Advances in Genome Biology, 5: 1-141.

Vaibhavi, J., Madhad, K. and Sentheil, P. (2014) Thr rapid and non-enzymatic isolation of DNA from the human peripheral whole blood suitable for genotyping. European journal of biotechnology and bioscience, 1(3): 1-16.